



ESTUDIO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE PANES DE DISTINTOS ORÍGENES

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2020/21

Alumno: Sara Portales Pino
Tutores: Manuel Gómez Pallarés
Irma Caro Canales

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)
Universidad de Valladolid

RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la calidad higiénico-sanitaria de cuatro tipos de panes elaborados artesanal e industrialmente, analizando tanto la corteza como la miga de los mismos. Para ello, se determinaron los recuentos de *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., coliformes, *E. coli*, *Salmonella* spp., BAL, FAM, mohos y levaduras. Además, se realizó una identificación de los principales microorganismos aislados del pan por espectrometría de masas MALDI-TOF. También se determinaron a_w , pH, NaCl y humedad de los panes. Los recuentos microbianos mayoritarios fueron *Bacillus* spp., coliformes y FAM, que de forma general tuvieron mayores recuentos en la barra integral y el pan candeal artesanales. Se identificaron especies con potencial patógeno por MALDI-TOF, como *E. cloacae*, *B. cereus*, *E. asburiae*, *M. tuberculosis*, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*, cuya presencia en el pan pudo ser debida a contaminación cruzada o a malas prácticas de higiene tras el horneado. La implementación y mejora de las buenas prácticas de higiene alimentaria tanto en procesos productivos artesanales como industriales, la desinfección de superficies de contacto, así como la formación y concienciación de los manipuladores de alimentos se proponen como medidas para reducir la contaminación del pan.

PALABRAS CLAVE: pan, microbiología, identificación microbiana, características fisicoquímicas

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the hygienic-sanitary quality of four types of artisan and industrially produced breads, analyzing both the crust and the crumb. For this purpose, counts of *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., coliforms, *E. coli*, *Salmonella* spp., LAB, APC, molds and yeasts were determined. In addition, identification of the main microorganisms isolated from the bread was performed by MALDI-TOF mass spectrometry. The a_w , pH, NaCl and moisture of the breads were also determined. The major microbial counts were *Bacillus* spp., coliforms and FAM, which generally had higher counts in the artisanal whole wheat loaf and *candeal* bread. Species with pathogenic potential were identified by MALDI-TOF such as *E. cloacae*, *B. cereus*, *E. asburiae*, *M. tuberculosis*, *C. guilliermondii* and *C. parapsilosis*, whose presence in the bread could be due to cross-contamination or poor hygiene practices after baking. The implementation and improvement of good food hygiene practices in both artisanal and industrial production processes, the disinfection of contact surfaces and the training and awareness of food handlers are proposed as measures to reduce bread contamination.

KEYWORDS: bread, microbiology, microbial identification, physical-chemical properties

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1 INTRODUCCIÓN	3
2 OBJETIVOS	7
3 MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS	7
3.2 TRATAMIENTO DE MUESTRAS	8
3.3 RECUEENTOS MICROBIANOS	8
3.3.1 ANÁLISIS <i>BACILLUS</i> SPP.	8
3.3.2 ANÁLISIS <i>CLOSTRIDIUM</i> SPP.	8
3.3.3 ANÁLISIS COLIFORMES Y <i>E. COLI</i>	9
3.3.4 ANÁLISIS <i>SALMONELLA</i> SPP.	9
3.3.5 RECUENTO DE BAL	9
3.3.6 ANÁLISIS FLORA TOTAL AEROBIA MESÓFILA	9
3.3.7 ANÁLISIS MOHOS Y LEVADURAS	9
3.4 AISLAMIENTO DE BACTERIAS	10
3.5 RECUPERACIÓN DE AISLAMIENTOS	10
3.5.1 MÉTODO DE TRANSFERENCIA DIRECTA EXTENDIDO	10
3.5.2 MÉTODO DE EXTRACCIÓN LARGA	11
3.6 ANÁLISIS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF	11
3.7 PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS	12
3.7.1 ACTIVIDAD DE AGUA	12
3.7.2 PH	12
3.7.3 NaCl	12
3.7.4 HUMEDAD	13
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1 RECUEENTOS MICROBIANOS	13
4.2 IDENTIFICACIÓN MICROBIANA MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF	19
5 CONCLUSIONES	25
6 BIBLIOGRAFÍA	26
7 ANEXOS	I
7.1 ANEXO I	I
7.2 ANEXO II	II

1 INTRODUCCIÓN

El pan es considerado un producto básico en la alimentación española. Su consumo per cápita en el año 2020 fue de 32,78 kg/persona/año (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2020). El endurecimiento del pan es la principal razón por la que se produce el desperdicio de este producto. Sin embargo, dependiendo del tipo de pan y de las condiciones de almacenamiento, el deterioro microbiológico altera sus características y provoca grandes pérdidas económicas (Cook & Johnson, 2009; Saranraj & Geetha, 2012). El desperdicio de alimentos supone un tercio de la producción mundial según el informe de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (Gustavsson et al., 2011). En 2018, según los datos del Panel de cuantificación del desperdicio alimentario en los hogares, el desperdicio de los hogares españoles en cuanto a alimentos y bebidas aumentó un 8,9%, alcanzando una cifra de 1.339 millones de kg (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2019). La apuesta por la reutilización de productos de repostería y pan para reducir este desperdicio ya ha sido implementada por algunas empresas como la británica *Toast Ale*, que aprovecha los excedentes del pan de panaderías y de fabricantes de sándwiches preelaborados para producir cerveza. Por otra parte, el proyecto BREAD4PLA coordinado por AIMPLAS, Instituto Tecnológico del Plástico en Valencia de España, ha empleado los desechos de la industria de la panadería para sintetizar un material plástico biodegradable, un ácido poliláctico (PLA) que pudieran utilizar las mismas empresas panaderas para crear nuevos envases para sus productos (BREAD4PLA, 2014; Lappin, 2016). No obstante, la repercusión de la carga microbiana en la posible reutilización de los panes debe ser evaluada.

La vida útil de los productos de panadería se ve limitada por dos tipos de alteraciones: la denominada "*staling bread*" que implica la retrogradación de la amilopectina, la pérdida y redistribución del agua, la oxidación de las grasas y la transformación del gluten (Curti et al., 2014); y al deterioro microbiológico producido por bacterias, levaduras y mohos en aquellos productos con actividad de agua (a_w) superior a 0,85 (Legan, 1993; Smith et al., 2004). Los tipos de microorganismos que se encuentran en los productos de panadería dependen de la calidad microbiológica de sus materias primas, del procesamiento del producto, de las condiciones higiénicas del proceso de fabricación y de las condiciones de almacenamiento y distribución del producto final (Cook & Johnson, 2009). El pH, la humedad y la a_w son las propiedades intrínsecas del producto que determinan el crecimiento microbiano en los alimentos. El pan, debido a su pH normalmente cercano a la neutralidad (entre 5,4 y 7,5), su contenido de humedad cercano al 40%, una a_w entre 0,75-0,98, sumado a que este producto suele almacenarse

a temperatura ambiente provee un ambiente favorable para el crecimiento de microorganismos que causan su deterioro (Cook & Johnson, 2009; Jay et al., 2008). Estas características advierten de que el pan es susceptible al deterioro microbiano.

Respecto a las materias primas, la harina utilizada puede llevar asociada una carga microbiana y con ello un problema potencial de seguridad alimentaria. La harina puede contener bacterias, levaduras y mohos psicrófilos, mesófilos o termófilos, así como micotoxinas, que podrían suponer un riesgo de salud pública (Sabillón & Bianchini, 2016). Cardoso et al. (2019) encontraron unos recuentos en harinas de trigo refinado de 4,33 Log UFC/g para flora total aerobia mesófila (FAM), de 2 Log UFC/g para coliformes, de 2,24 Log UFC/g para levaduras, de 2,46 Log UFC/g para mohos e inferior a 2 Log UFC/g para clostridios sulfito reductores. Aunque el tratamiento térmico que se le aplica al pan para su cocción puede eliminar la contaminación microbiana relativa a sus ingredientes, especialmente en la corteza, es posible que exista una contaminación posterior al horneado (Cook & Johnson, 2009). A pesar de ello, no hay que olvidar que la mayoría de las micotoxinas son resistentes a los tratamientos térmicos y, por lo tanto, estas permanecerán en el producto final. Esta re-contaminación puede ser transmitida por el aire, que puede contener esporas de moho, o por contaminación cruzada con los equipos, utensilios, manipuladores, así como el tipo de fermentación utilizada, el tamaño y disposición del obrador y el envasado del producto final (Cook & Johnson, 2009; Lavermicocca et al., 2000). Uno de los aspectos fundamentales que promueven el crecimiento de mohos y levaduras en los productos de panadería es envolver estos productos después de hornearlos cuando aún mantienen una temperatura elevada, pues se puede provocar condensación en el interior del paquete y en la superficie del producto (Cook & Johnson, 2009).

Debido a las características intrínsecas del pan, como la baja a_w , es posible que los mohos sean la principal vía de contaminación después de la cocción, especialmente especies de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (Cook & Johnson, 2009; Katsi et al., 2021). Las primeras señales de alteración en pan causada por mohos son su propio crecimiento, pues cambia el aspecto del producto. El crecimiento de mohos se evidencia primero como colonias blancas, filamentosas o “difusas” que gradualmente cambian a un color de azul verdoso a negro conforme se producen esporas (Vora & Sidhu, 1987). Los mohos habitualmente implicados en el deterioro de los productos de panadería pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Monilia*, *Endomyces*, *Rhizopus* y *Mucor* (Legan, 1993; Legan & Voysey, 1991). Aunque el deterioro por el crecimiento de levaduras es menos frecuente, pueden causar deterioro en la superficie del producto creando áreas blancas o rosadas. Entre las levaduras

normalmente implicadas en estos daños se encuentran los géneros *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Candida* y *Zygosaccharomyces* (Van Der Zee & Huis In T Veld, 1997).

Además del deterioro causado por mohos y levaduras, el pan puede verse afectado por el crecimiento de bacterias debido a una re-contaminación después del horneado, favorecido por la existencia de niveles elevados de a_w , entre 0,94 y 0,99 (Smith et al., 2004). Las bacterias formadoras de esporas pertenecientes al género *Bacillus*, especialmente *B. subtilis*, son las responsables de la segunda causa principal de deterioro de productos de panadería conocida como “deterioro de la cuerda” o “*rope spoilage*” (Katsi et al., 2021), cuyo nombre hace referencia a la formación de una textura viscosa y fibrosa en el pan. Sin embargo, con los cambios implementados en la panadería actual, con mayores medidas higiénicas y un mayor control de los ingredientes y procesos, este no suele ser un problema en España.

A pesar de que muchos microorganismos pueden ser eliminados con el horneado al que se somete el pan, las esporas microbianas pueden resistir este tratamiento térmico y sobrevivir al proceso de horneado, especialmente en la miga del producto donde no se superan los 100 °C (Valerio et al., 2012). Cuando las condiciones son favorables, con temperatura > 25 °C, $a_w \geq 0,95$ y $pH > 5$, las esporas germinan convirtiéndose en células vegetativas que deterioran la textura del pan, generando el mencionado deterioro de la cuerda. Este fenómeno es causado por la formación de limo, resultado de la actividad de las enzimas proteolíticas y amilolíticas de algunas especies del género *Bacillus* (Martínez Viedma et al., 2011), con predominio de contaminación por *B. subtilis* por su mayor resistencia al proceso de cocción (Valerio et al., 2015), aunque también están asociados *B. licheniformis*, *B. cereus* y *B. mesentericus* (Saranraj & Sivasakthivelan, 2015).

El deterioro de la cuerda genera un pan de textura viscosa y se caracteriza por tener un olor dulce a fruta similar a melón, con una miga de aspecto descolorido, pegajosa, pastosa y fibrosa si la degradación sigue avanzando (Pepe et al., 2003). Este hecho puede advertirse 12-24 h después de haberse completado la cocción del pan, siendo el pan de molde el más susceptible a esta degradación. Es más común en áreas geográficas cálidas y húmedas, pues en estas condiciones se favorece el crecimiento de especies de *Bacillus* (Saranraj & Sivasakthivelan, 2015). Las esporas de *Bacillus* spp. pueden germinar y multiplicarse en alimentos con alta humedad y poco ácidos, a temperaturas desde 4 o 5 °C hasta 55 °C (EFSA, 2005; Kramer & Gilbert, 1989). El desarrollo de los microorganismos que causan el deterioro de la cuerda puede tener

distinto origen, entre los que encontramos las harinas, las materias primas contaminadas durante el proceso de molienda (Richter et al., 1994), la levadura o los mejoradores del pan, así como el equipo de procesamiento (Lavermicocca et al., 2016).

Otro problema relacionado con el crecimiento de microorganismos alterantes es el sabor amargo de los productos de panadería. Este es causado por el metabolismo bacteriano que degrada los carbohidratos en ácidos orgánicos como el ácido láctico. En algunos casos este efecto es buscado y beneficioso, como en los panes de masa madre o el pan de centeno agrio. Sin embargo, este fenómeno en otros productos es indeseable y contribuye al deterioro del pan (Cook & Johnson, 2009). Las especies del género *Lactobacillus* son las responsables de este efecto, entre las que se encuentran *L. plantarum*, *L. casei*, *L. alimentarius*, *L. fermentum*, *L. buchneri* o *L. acidophilus*, entre otros. Otros géneros bacterianos asociados a este tipo de deterioro son *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* o *Weissella* (Stiles & Holzapfel, 1997).

Existen otros microorganismos que pueden contaminar el pan al encontrarse en los manipuladores, en el material y en las materias primas con las que el producto terminado puede entrar en contacto, derivando en una contaminación cruzada. Este es el caso de *Salmonella* spp., típicamente asociada al uso de huevos contaminados pero que también puede encontrarse en productos lácteos como leche, mantequilla, nata y queso (El-Gazzar & Marth, 1992). Estos ingredientes crudos que pueden contener *Salmonella* spp. pueden entrar en contacto con las materias primas del pan o con el producto final y suponer un foco de transmisión de salmonelosis (Evans et al., 1996). De la misma manera, *Clostridium botulinum* puede estar presente en forma de esporas en el suelo, en los ingredientes de panadería o en los productos terminados (Deible & Swanson, 2001). Aunque no se han reportado brotes de botulismo relacionados con productos de panadería, ha sido demostrado que las condiciones de los productos de panadería ($\text{pH} > 4,6$ y $a_w > 0,95$) crean un ambiente adecuado para el crecimiento de este patógeno, por lo que sería conveniente evaluar el riesgo de su contaminación de forma independiente y en función de los ingredientes utilizados para la formulación del producto (Smith et al., 2004). Por otro lado, los coliformes y *E. coli* se utilizan habitualmente como indicadores de la higiene y desinfección en la industria alimentaria. Estas bacterias pueden estar presentes en el grano o en los productos molidos (Doyle & Buchanan, 2012). Diversos autores han observado la presencia de estos patógenos en harina de trigo (Berghofer et al., 2003; Richter et al., 1994; Sperber, 2007), lo que podría indicar malas prácticas higiénicas durante la manipulación y el procesamiento, debido a que estos microorganismos son transmitidos por heces (Sabillón & Bianchini, 2016). Sin embargo, la contaminación con materias primas ocurre en raras ocasiones

en la panadería actual, por lo que no suele ser un problema y solo se consideraría como tal en ocasiones especiales, donde no se cumplen las medidas higiénicas o su control es menor, como podría ser el caso de pequeños obradores.

En este trabajo se ha realizado un estudio de la microbiología del pan debido a su importancia y a que no se han realizado otros estudios sobre este tema, o no al menos teniendo en cuenta los siguientes factores. Para ello, se seleccionaron cuatro tipos de panes (barra de pan blanco, barra de pan integral, pan candeal y pan de molde) adquiridos de dos pequeñas panaderías y de dos cadenas de supermercados, en dos días diferentes en cada uno de ellos, y se separaron las cortezas y migas de cada uno de los panes. Se determinó para las muestras obtenidas a_w , pH, humedad, contenido de NaCl, así como la presencia de los siguientes grupos microbianos: *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., coliformes, *E. coli*, *Salmonella* spp., bacterias ácido lácticas (BAL), FAM, mohos y levaduras. Además, se realizó una identificación de los principales microorganismos aislados del pan mediante espectrometría MALDI-TOF. Se ha realizado un análisis de varianza para estudiar las diferencias significativas y un análisis de componentes principales, teniendo en cuenta los tipos de microorganismos analizados.

2 OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es estudiar la calidad higiénico-sanitaria de diversos tipos de panes elaborados artesanal e industrialmente mediante el recuento de los principales grupos microbianos presentes en este producto.

Los objetivos específicos planteados son:

- Establecer los principales parámetros intrínsecos de los diversos tipos de pan, sus partes (corteza y miga) y su forma de elaboración.
- Establecer los niveles de los recuentos microbianos de los principales microorganismos que pueden crecer en las distintas partes del pan (miga y corteza) en función del tipo de pan y de la forma de elaboración.
- Identificar las principales especies bacterianas que pueden estar presentes en las distintas partes del pan (miga y corteza) en función del tipo de pan y de la forma de elaboración.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se recogieron las muestras de cuatro tipos de panes diferentes: una barra de pan blanco, una barra de pan integral, un pan candeal y un pan de molde. Los panes se

obtuvieron de cuatro establecimientos diferentes en Valladolid: dos panaderías locales (Masa Madre y El Fiel), identificados como establecimientos artesanales; y dos supermercados (Mercadona, Camino del Cementerio; y Lupa, Calle Real de Burgos), identificados como establecimientos industriales. Esta operación se realizó por duplicado, en dos días alternos para cada uno de los establecimientos y tipos de panes. Las muestras se transportaron hasta el laboratorio en un sobre de papel.

3.2 TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Tras recepcionar los panes en el laboratorio, se separó por un lado la miga y por otro la corteza con la ayuda de un cuchillo previamente esterilizado, y se redujo el tamaño de las muestras en porciones de aproximadamente 2 cm². Se pesaron 25 g de muestra que fueron homogeneizados durante 3 min con ayuda de una bolsa Stomacher con filtro, a los cuales se agregaron 225 mL de agua de peptona tamponada (BPW, VWR: 84600.0500).

3.3 RECIENTOS MICROBIANOS

Se realizaron recuentos de los siguientes grupos microbianos: *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., coliformes, *E. coli*, *Salmonella* spp., BAL, FAM, mohos y levaduras.

3.3.1 Análisis *Bacillus* spp.

Los recuentos de *Bacillus* spp. se realizaron siguiendo las recomendaciones de Eglezos (2010) y Tallent et al. (2020). Brevemente, se sembraron 0,1 mL de las diluciones adecuadas para los recuentos en Agar Selectivo para *B. Cereus* (PEMBA, Merck: 1.20589.0500), suplementado con polimixina B (VWR Chemicals: 928020NL) y emulsión estéril yema de huevo (Condalab: 5152-R9). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se contaron las colonias de acuerdo con ISO 4832:2006.

3.3.2 Análisis *Clostridium* spp.

Los recuentos de *Clostridium* spp. se realizaron siguiendo las recomendaciones de Cardoso et al. (2019). Brevemente, se sembraron 5 mL de las diluciones apropiadas a un tubo Falcon de 50 mL y se sometieron a un tratamiento térmico en un baño de agua a 80 °C durante 10 min. Las diluciones se enfriaron inmediatamente en hielo y se añadieron 25 mL de agar sulfito de hierro (ISA, Merck: 1.10864.0500) con Hierro (II) sulfato heptahidrato ≥ 98% (VWR Chemicals: 24240.295). La mezcla se homogeneizó y se dejó solidificar. Posteriormente, se añadieron 5 mL del medio agar sulfito de hierro para crear anaerobiosis. Los tubos Falcon se incubaron a 30 °C durante 48 h y se contaron los puntos negros.

3.3.3 Análisis coliformes y *E. coli*

Los recuentos de coliformes y *E. coli* se realizaron siguiendo las recomendaciones de Cardoso et al. (2019). Brevemente, se agregaron 1 mL de las diluciones adecuadas en placas Petrifilm (3M: 6404/6414/6444). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h, y el recuento se llevó a cabo de acuerdo con ISO 4832:2006.

3.3.4 Análisis *Salmonella* spp.

Los recuentos de *Salmonella* spp. se realizaron siguiendo las recomendaciones de Cardoso et al. (2019). Brevemente, las muestras iniciales homogeneizadas en BPW se incubaron durante 24 h en condiciones aerobias a 37 °C. A continuación, se añadieron 0,1 mL de las diluciones apropiadas a los tubos con 10 mL del medio de enriquecimiento Ramba QUICK *Salmonella* (CHROMagar: SQ001) y se incubaron a 41 °C durante 6 h. Posteriormente, se realizó una siembra por estría en superficie en medio *Salmonella* Plus base (CHROM, CHROMagar: SA162(B)), suplementado con *Salmonella* Plus (CHROMagar: SA162(S)) y con CHROMagar White Opaque (CHROMagar: SU702). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se contaron las colonias moradas.

3.3.5 Recuento de BAL

Los recuentos de BAL se realizaron siguiendo las recomendaciones de Fuentes et al. (2015). Brevemente, se sembró 1 mL de las diluciones adecuadas en placas de Petri vacías, se agregó 10 mL de agar Man Rogosa Sharpe (MRS, VWR Chemicals) y a continuación se dejó solidificar el agar; por último, se agregó una segunda capa del agar de 5 mL para crear anaerobiosis. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h, y se contaron de acuerdo con ISO 4832:2006.

3.3.6 Análisis flora total aerobia mesófila

Los recuentos de FAM se realizaron siguiendo las recomendaciones de Cardoso et al. (2019). Brevemente, se añadió 1 mL de las diluciones adecuadas a placas de Petri vacías y se agregaron aproximadamente 15 mL de Agar Plate Count (PCA, VWR Chemicals: 85941.0500). Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h, y se contaron de acuerdo con ISO 4832:2006.

3.3.7 Análisis mohos y levaduras

Los recuentos de mohos y levaduras se realizaron siguiendo las recomendaciones de Cardoso et al. (2019). Brevemente, se agregaron 0,2 mL de las diluciones adecuadas en placas de Petri con 15 mL de Agar Base Dichloran-Glycerol (DG18, Thermo Fisher Diagnostics: CM0729), suplementado con Cloranfenicol (VWR Chemicals: 928260NL).

Las placas se incubaron a 25 °C durante 72 h para el recuento de levaduras y durante 120 h para el recuento de mohos, de acuerdo con ISO 21527-2:2008.

3.4 AISLAMIENTO DE BACTERIAS

A partir de las placas de MRS, PEMBA, CHROM e ISA crecidas se recogieron dos colonias que fueran representativas de la población microbiana. Las colonias provenientes de los medios PEMBA, CHROM e ISA fueron sembradas en un tubo Eppendorf con 1 mL de caldo soja tripticaseína (TSB, Condalab: 1224.00), y las colonias provenientes del medio MRS fueron sembradas en 1 mL de caldo TSB con 0,5% extracto de levadura (Condalab: 1702.00). Las colonias fueron incubadas durante 24 h a 37 °C en el caso de las colonias provenientes de los medios PEMBA y CHROM, y a 30 °C en el caso de las colonias provenientes de los medios MRS e ISA. Los tubos incubados se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante 5 min en una centrífuga. A continuación, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 1 mL de un medio compuesto por 50% de TSB y 50% de glicerol. Las cepas fueron congeladas a -20 °C hasta su utilización.

3.5 RECUPERACIÓN DE AISLAMIENTOS

Las colonias almacenadas en congelación en TSB y glicerol se sembraron en caldo de TSB con 0,5% de extracto de levadura, y se incubaron durante 24 h a 37 °C en el caso de las colonias provenientes de los medios PEMBA y CHROM Agar, y a 30 °C en el caso de las colonias provenientes de los medios MRS e ISA. Posteriormente, las colonias provenientes de los medios PEMBA, CHROM e ISA se sembraron en placas con agar PCA y las colonias provenientes de MRS se sembraron en placas con agar MRS, mediante la técnica de siembra en estría. Las placas se incubaron durante 24 h a la temperatura indicada previamente en función del tipo de microorganismo. A continuación, se prepararon las muestras para el análisis mediante Espectrometría de Masas MALDI-TOF con el sistema MALDI BioTyper (Bruker Daltonik), llevado a cabo en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de Valladolid.

Se realizaron dos métodos de preparación de muestras para el análisis mediante MALDI-TOF: transferencia directa extendido y extracción larga, siguiendo las indicaciones del proveedor (Bruker Daltonik) y según lo descrito más abajo. Las colonias no identificadas mediante el método de transferencia directa extendido se identificaron realizando el método de extracción larga.

3.5.1 Método de transferencia directa extendido

Una colonia de un cultivo incubado durante 24 h se transfirió a la placa de ensayo (Steel Target Sample Plate) del MALDI-TOF y se dejó secar a temperatura ambiente. A

continuación, se agregó 1 μL de ácido fórmico al 70% sobre cada pocillo y se dejó secar nuevamente al aire. Posteriormente, se agregó 1 μL de matriz ácido α -cyano-4-hidroxicinámico disuelta en una solución saturada de acetonitrilo y ácido trifluoroacético y se dejó secar. Finalmente, se realizó el análisis con el analizador MALDI-TOF siguiendo las instrucciones de proveedor (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Alemania).

3.5.2 Método de extracción larga

Una colonia de las placas con los aislamientos puros recuperados se transfirió a un tubo Eppendorf con 1 mL de caldo TSB con 0,5% de extracto de levadura y se incubó durante 24 h a la temperatura indicada previamente en función del tipo de microorganismo. El cultivo se centrifugó a 13.200 r.p.m. durante 2,5 min. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de agua destilada estéril al pellet, se agitó y se centrifugaron de nuevo a 13.200 r.p.m. durante 2,5 min. Se repitió este proceso una segunda vez, volviendo a centrifugar con las mismas condiciones. A continuación, se descartó el sobrenadante y se agregaron 300 μL de agua purificada y 900 μL de etanol al 100% a cada tubo. Los tubos se agitaron y se centrifugaron a 13.200 r.p.m. durante 5,5 min, repitiendo el proceso. Seguidamente, se retiró el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 13.200 r.p.m. durante 2,5 min. Posteriormente, se retiró el etanol sobrante con la ayuda de una pipeta procurando no eliminar el pellet. Este se dejó secar durante al menos 30 min en campana extractora. Cuando los pellets estuvieron completamente secos, se añadieron 10 μL de ácido fórmico al 70% a cada tubo Eppendorf, se agitaron para su correcta hidratación y se dejó actuar durante 5 min. A continuación, se agregaron 10 μL de acetonitrilo a cada tubo, se agitaron y se centrifugaron a 13.200 r.p.m. durante 5,5 min. 1 μL de sobrenadante se transfirió a la placa de ensayo (Steel Target Sample Plate) del MALDI-TOF. Se dejó secar completamente a temperatura ambiente antes de agregar 1 μL de matriz ácido α -cyano-4-hidroxicinámico disuelta en una solución saturada de acetonitrilo y ácido trifluoroacético a cada pocillo, y se dejó secar. Finalmente, se realizó el análisis con el analizador MALDI-TOF siguiendo las instrucciones de proveedor (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Alemania).

3.6 ANÁLISIS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

El análisis mediante espectrometría de masas se realizó usando Flex Analysis (Bruker Daltonik). Para ello, se realizó una calibración externa del espectro de masas utilizando un estándar *E. coli* DH5. Posteriormente, el procedimiento se realizó en modo automático.

Para la identificación de los microorganismos problema a través del espectro de masas obtenido, se procesó con el programa BioTyper (Bruker Daltonik). La lista de

picos generada se comparó con la biblioteca de referencia del MALDI BioTyper, usando un algoritmo de comparación integrado en el programa.

En función de la semejanza de los espectros obtenidos para las muestras con la librería de datos se obtienen puntuaciones. Para conseguir la identificación del género del microorganismo analizado se requiere una puntuación de 1,700-1,999. En cambio, para conseguir la identificación de género y especie se requieren puntuaciones superiores a 2,000.

3.7 PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS

3.7.1 Actividad de agua

Se pesaron 5 g de cada muestra y se depositaron en cápsulas de medida, las cuales se taparon herméticamente hasta su medición. Para su medición se empleó un aparato Aqualab CX-2 (Decagon Devices, Inc.). Las medidas se realizaron por duplicado y a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C).

3.7.2 pH

Se mezclaron 5 g de cada muestra, previamente molida, con 20 mL de agua destilada, que se mantuvieron durante 5 min para la posterior determinación del pH (Cardoso et al., 2019). Para su medición se empleó un potenciómetro digital (Crisol, modelo GLP 22) conectado a un electrodo de pH (Crisol, modelo 52 31). Las medidas se realizaron por duplicado a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C).

3.7.3 NaCl

La determinación de NaCl se llevó a cabo mediante el método Volhard a través de una valoración potenciométrica, siguiendo las indicaciones de la norma ISO 1841-2 que se adaptó para la medida de este compuesto en panes y que se describe a continuación. Se pesaron aproximadamente $5 \text{ g} \pm 0,01\text{g}$ de la muestra en un vaso de precipitado en una balanza de precisión, se agregaron 45 mL de agua destilada y se homogeneizaron durante 1 min en un homogeneizador (Ultra turrax t-25). Una vez homogenizada la muestra se centrifugó con ayuda de una centrífuga a 2000 r.p.m durante 2 min. 25 mL del sobrenadante se depositaron en un vaso de precipitado y se agregaron 25 mL de ácido nítrico al 2% (Sigma) para acidificar la muestra. La mezcla se tituló con ayuda de un titulador automático (Metrohm, 719 S Tritino) y un electrodo selectivo de cloruros. Previamente se realizó una curva de calibración.

Para el cálculo de la concentración de NaCl se utilizó la **Ecuación 1**.

Ecuación 1. Cálculo de la concentración de NaCl

$$\frac{V \text{ AgNO}_3 \times C \text{ AgNO}_3 \times 1\text{L}/1000\text{mL} \times Pm \text{ NaCl}}{V \text{ suspensión}}$$

V AgNO₃: volumen de nitrato de plata utilizado; *C AgNO₃*: concentración de nitrato de plata (0,1 mol/ L AgNO₃); *Pm NaCl*: peso molecular del cloruro de sodio (58,44 g/mol); *V suspensión*: volumen utilizado de la suspensión (10 mL).

3.7.4 Humedad

Se pesaron 5 g de cada muestra, anteriormente molida, en cápsulas de aluminio previamente pesadas y se mantuvieron a 105 °C hasta peso constante, de acuerdo con AOAC International (2016).

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados expresados son la media ± desviación estándar. Para el análisis de los recuentos microbiológicos y los parámetros fisicoquímicos por tipo de establecimiento, tipo de pan y corteza o miga se realizó un análisis de varianza (ANOVA) simple utilizando el método estadístico de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con un nivel del 95% de confianza ($p < 0,05$). Los análisis de ANOVA y de Componentes Principales (PCA) se realizaron utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVIII (StatPoint Technologies Inc, Warrenton, EEUU). Para el análisis de la identificación microbiana mediante MALDI-TOF se utilizó el programa incorporado en el equipo, denominado BioTyper, y finalmente para el análisis de los datos se utilizó el programa Excel (*Office 2019*).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RECIENTOS MICROBIANOS

Los resultados de los recuentos microbianos analizados en los cuatro tipos de panes, en cada tipo de establecimiento y en función de la corteza o la miga se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Análisis de microorganismos identificados en los diferentes tipos de establecimientos, tipos de panes y en corteza o miga

Establecimiento	Tipo de pan	Corteza/ Miga	<i>Bacillus spp.</i> Log ₁₀ UFC/g	<i>Clostridium spp.</i> Log ₁₀ UFC/g	Coliformes Log ₁₀ UFC/g	<i>Salmonella spp.</i> Log ₁₀ UFC/g	BAL Log ₁₀ UFC/g	FAM Log ₁₀ UFC/g	Levaduras Log ₁₀ UFC/g	Mohos Log ₁₀ UFC/g
Artesanal	Barra	Corteza	2,69 ± 1,12 ^{cd}	0,00 ± 0,00 ^a	1,32 ± 0,43 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,40 ± 0,80 ^{ab}	1,74 ± 1,26 ^{abc}	0,00 ± 0,00 ^a	1,01 ± 1,16 ^a
		Miga	1,80 ± 2,37 ^{abc}	0,23 ± 0,45 ^{ab}	1,35 ± 0,40 ^a	0,50 ± 1,00 ^{ab}	0,25 ± 0,50 ^{ab}	1,66 ± 1,19 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^a	0,91 ± 1,05 ^a
	Barra integral	Corteza	2,12 ± 1,48 ^{abc}	0,57 ± 0,66 ^b	2,24 ± 0,35 ^{cd}	0,00 ± 0,00 ^a	1,13 ± 0,85 ^{bc}	3,10 ± 0,80 ^e	0,79 ± 1,59 ^{ab}	1,20 ± 1,38 ^a
		Miga	2,16 ± 1,58 ^{abc}	0,49 ± 0,57 ^{ab}	2,42 ± 0,39 ^e	0,00 ± 0,00 ^a	0,71 ± 0,88 ^{abc}	2,93 ± 0,85 ^{de}	0,79 ± 1,59 ^{ab}	1,12 ± 1,32 ^a
	Pan candeal	Corteza	4,76 ± 0,47 ^d	0,00 ± 0,00 ^{ab}	1,68 ± 0,96 ^{abcd}	1,29 ± 1,82 ^{ab}	0,92 ± 1,30 ^{abc}	5,49 ± 0,57 ^f	0,00 ± 0,00 ^{ab}	1,85 ± 0,21 ^a
		Miga	4,69 ± 1,01 ^d	0,00 ± 0,00 ^{ab}	1,72 ± 0,60 ^{abcd}	1,87 ± 2,64 ^b	1,15 ± 0,21 ^{abc}	5,53 ± 0,52 ^f	0,00 ± 0,00 ^{ab}	0,85 ± 1,20 ^a
	Pan de molde	Corteza	1,99 ± 1,40 ^{abc}	0,00 ± 0,00 ^a	1,54 ± 0,12 ^{ab}	1,59 ± 1,97 ^b	1,48 ± 1,19 ^c	2,76 ± 1,04 ^{cde}	1,63 ± 1,90 ^b	0,85 ± 0,98 ^a
		Miga	1,76 ± 1,22 ^{abc}	0,00 ± 0,00 ^a	1,69 ± 0,20 ^{abc}	1,44 ± 1,81 ^b	1,04 ± 0,69 ^{abc}	2,44 ± 1,09 ^{bcde}	0,75 ± 1,50 ^{ab}	0,42 ± 0,85 ^a
Industrial	Barra	Corteza	2,18 ± 0,28 ^{abc}	0,08 ± 0,15 ^{ab}	1,37 ± 0,22 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,73 ± 0,85 ^{abc}	1,95 ± 0,25 ^{abcd}	0,67 ± 1,35 ^{ab}	1,39 ± 0,95 ^a
		Miga	2,30 ± 0,32 ^{bc}	0,00 ± 0,00 ^a	1,38 ± 0,06 ^a	0,50 ± 1,00 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^a	1,64 ± 0,48 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^a	0,92 ± 1,07 ^a
	Barra integral	Corteza	2,26 ± 0,23 ^{bc}	0,00 ± 0,00 ^a	2,02 ± 0,39 ^{bcde}	0,00 ± 0,00 ^a	0,25 ± 0,50 ^{ab}	1,84 ± 0,66 ^{abc}	0,00 ± 0,00 ^a	1,02 ± 1,18 ^a
		Miga	2,04 ± 0,08 ^{abc}	0,11 ± 0,23 ^{ab}	2,17 ± 0,26 ^{cde}	0,00 ± 0,00 ^a	0,25 ± 0,50 ^{ab}	1,48 ± 0,26 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^a	1,39 ± 0,96 ^a
	Pan candeal	Corteza	1,00 ± 1,15 ^{abc}	0,27 ± 0,54 ^{ab}	1,73 ± 0,68 ^{abcd}	0,00 ± 0,00 ^a	0,51 ± 1,03 ^{abc}	1,92 ± 0,16 ^{abcd}	0,79 ± 1,58 ^{ab}	0,50 ± 1,00 ^a
		Miga	0,65 ± 1,30 ^{ab}	0,27 ± 0,54 ^{ab}	1,64 ± 0,49 ^{abc}	0,00 ± 0,00 ^a	0,38 ± 0,77 ^{ab}	1,25 ± 0,87 ^a	0,67 ± 1,35 ^{ab}	0,51 ± 1,02 ^a
	Pan de molde	Corteza	0,50 ± 1,00 ^a	0,23 ± 0,45 ^{ab}	1,40 ± 0,20 ^a	0,50 ± 1,00 ^{ab}	0,50 ± 0,58 ^{abc}	1,35 ± 0,22 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^a	1,27 ± 0,85 ^a
		Miga	1,08 ± 1,25 ^{abc}	0,13 ± 0,27 ^{ab}	1,35 ± 0,16 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,75 ± 0,50 ^{abc}	1,26 ± 0,24 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,92 ± 1,07 ^a

^{a-e} Columnas con distintas letras indica diferencias significativas ($p < 0,05$). $n = 4$, cada valor corresponde a la media de 4 ensayos

En la mayoría de los recuentos microbianos realizados no se observaron diferencias significativas. En algunos casos se encontró una carga microbiana reducida, con muestras con recuentos por debajo del límite de cuantificación (LOQ = 1 Log UFC/g), pero en otras muestras se observaron recuentos microbianos elevados que podrían suponer un problema higiénico-sanitario, como se comentará a continuación.

No se han encontrado diferencias significativas para los recuentos de *Bacillus spp.* entre las migas y cortezas, ni entre el tipo de establecimiento. Entre los tipos de panes no se observaron diferencias significativas salvo para el pan candeal artesanal, tanto en la corteza como en la miga, con valores de $4,76 \pm 0,47$ Log UFC/g y $4,69 \pm 1,01$ Log UFC/g respectivamente. Estas diferencias pueden deberse a que el pan candeal tenga un circuito de almacenamiento y transporte diferente al resto, con mayor riesgo de contaminación. Los recuentos de *Bacillus spp.* en la mayoría de los panes se encontraron entre 0,50 Log UFC/g y 2,69 Log UFC/g, niveles intermedios en comparación a los recuentos observados por Katsi et al. (2021). Estos autores encontraron unos recuentos de *B. cereus* en un pan estándar por debajo del límite de

detección (2 Log UFC/g) en el día 0 de almacenamiento del pan, alcanzando 6,3 Log UFC/g el día 8 de conservación del pan. Por otra parte, los recuentos encontrados en el presente estudio fueron inferiores a los niveles asociados con enfermedades transmitidas por alimentos contaminados por *Bacillus* spp., como lo indican Valerio et al. (2012) quienes mencionan que se requieren unos recuentos entre 5 y 9 Log UFC/g de estos microorganismos. Las diferencias observadas en los recuentos de *Bacillus* spp. del pan candeal respecto al resto de panes de este estudio pueden ser debidas al tamaño de la pieza de pan. Kaur (1986) indica que este tipo de microorganismos pueden sobrevivir al proceso de horneado en piezas de pan con un peso de 800 g, pero no sobreviven en aquellas que tienen un peso de 400 g. En este estudio las muestras del pan tipo candeal analizado superaban los 500 g. Aunque los panes analizados mostraron niveles elevados para *Bacillus* spp. pueden considerarse seguros al menos hasta tres días después de su elaboración. Sin embargo, si se almacenan durante más de tres días a una temperatura de 27,5 °C, *B. cereus*, que pudo sobrevivir al proceso de horneado, puede alcanzar niveles hasta 5 Log UFC/g, concentración causante de enfermedad en el ser humano (Kaur, 1986).

Los recuentos de *Clostridium* spp. nunca superaron los 0,27 Log UFC/g, con excepción de la corteza de la barra integral artesanal donde se alcanzaron valores de $0,57 \pm 0,66$ Log UFC/g. Al igual que ocurre en el caso de *Bacillus* spp., no se observaron diferencias significativas entre corteza y miga, ni entre panes artesanales o industriales entre los distintos tipos de panes, con excepción de la corteza de la barra y el pan de molde artesanales, o la corteza de la barra integral y la miga de la barra industriales, que mostraron recuentos por debajo del LOQ. Si las especies de *Bacillus* y *Clostridium* están presentes en el pan puede producirse un crecimiento de ambos patógenos hasta niveles peligrosos para la salud, particularmente cuando se abusa de la temperatura en las condiciones de almacenamiento (Smith et al., 2004). A pesar de no encontrarse brotes de botulismo asociados al consumo de productos de panadería en países occidentales, se registró un presunto brote en India producido por un pan plano crujiente elaborado con harina de garbanzo. Este brote fue atribuido al crecimiento y producción de neurotoxina tipo E por *C. butyricum*, y se relacionó con el almacenamiento inadecuado del pan implicado (Chaudhry, 1998).

Respecto a los recuentos de coliformes, no se observaron diferencias significativas entre corteza y miga, ni entre tipo de establecimiento. Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre las barras integrales, tanto artesanales como industriales para corteza y para miga, con las barras (artesanales e industriales) y con el pan de molde industrial. La miga de la barra integral artesanal fue la que mostró los recuentos

más elevados de coliformes ($2,42 \pm 0,39$ Log UFC/g), a pesar de no mostrar diferencias significativas con el resto de barras integrales. La miga del pan candeal artesanal mostró los mayores recuentos de presuntas *Salmonella* spp., con $1,87 \pm 2,64$ Log UFC/g. La mayor parte de los panes artesanales tuvieron recuentos positivos para este microorganismo. Excepto la miga de la barra y la corteza del pan de molde industriales, que presentaron $0,50 \pm 1,00$ Log UFC/g cada uno, los panes industriales tuvieron recuentos para presuntas *Salmonella* spp. por debajo del LOQ. Hasta este momento no hay estudios en el pan que permitan realizar la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, cabe mencionar que la presencia tanto de coliformes como de presunta *Salmonella* spp. hace presumir de un manejo higiénico inadecuado de este producto. Este hecho indica que se requiere una estricta supervisión en la higiene, en la formación de los manipuladores de alimentos y la implementación de un sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) (Smith et al., 2004).

No se observaron diferencias significativas entre la corteza y miga, ni entre el tipo de establecimiento, ni entre los distintos tipos de pan respecto a los recuentos de BAL. Los recuentos más elevados de BAL se observaron en la corteza del pan de molde artesanal ($1,48 \pm 1,19$ Log UFC/g), mientras que la miga de la barra industrial tuvo recuentos por debajo del LOQ. Estos datos coinciden con los observados por Katsi et al. (2021), quienes mostraron unos recuentos inferiores a 1 Log UFC/g de BAL en pan estándar, alcanzando niveles de 5,2 Log UFC/g el día 6 de almacenamiento de las muestras. En el presente estudio, el agar MRS no fue un medio muy selectivo para el recuento de BAL. La mayoría de las cepas aisladas de este medio fueron identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* y, en menor medida, como *Leuconostoc mesenterioides*. Este microorganismo se ha aislado de harinas de trigo (Alfonzo et al., 2013), por lo que su presencia en el pan podría ser debida a que resista la temperatura de horneado. De hecho, es considerado un microorganismo termodúrico porque resiste la pasteurización, puede crecer entre 4,5 y 6,3 de pH y una temperatura entre 10 y 45 °C (Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004). Respecto al pH, los panes analizados muestran unos niveles para este parámetro entre 6,19 y 5,50 (**Anexo I**), por lo que permitirían el crecimiento de *Leuconostoc* spp.

Los resultados observados para FAM mostraron mayores recuentos en los panes candeales artesanales, tanto en miga y corteza, con $5,53 \pm 0,52$ Log UFC/g y $5,49 \pm 0,57$ Log UFC/g respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos. Los panes artesanales en general fueron en los que se observó el mayor número de recuentos para este grupo microbiano, y fue en la miga del pan candeal industrial donde se

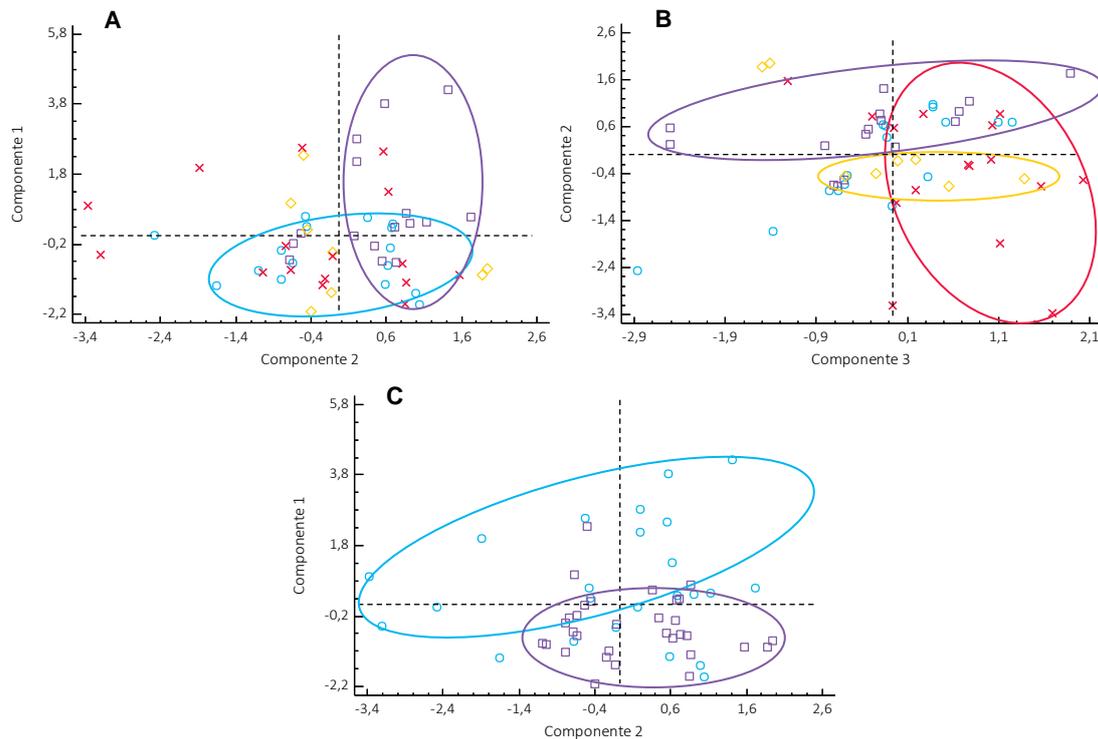
observaron los menores recuentos ($1,25 \pm 0,87$ Log UFC/g). Hasta este momento de acuerdo a la bibliografía encontrada, no existen estudios para comparar los valores de FAM en corteza y miga. Katsi et al. (2021) encontraron unos recuentos para FAM en un pan estándar de 2,9 Log UFC/g, estos recuentos fueron similares a los obtenidos en el presente estudio para los panes artesanales excepto la barra, que tanto en la corteza como en la miga presentó recuentos inferiores, de $1,74 \pm 1,26$ Log UFC/g y de $1,66 \pm 1,19$ Log UFC/g respectivamente. Además, estos autores indicaron que los recuentos de FAM tras 4 días de almacenamiento alcanzaron unos recuentos de 6,0 Log UFC/g, por lo que las muestras de los panes candeales artesanales analizados en el presente estudio probablemente aumentarán su carga microbiana con el almacenamiento hasta alcanzar una cantidad considerada por la ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1986) que puede ocasionar alteraciones de las características del pan.

Respecto a los niveles de levaduras, se observaron los mayores recuentos en la corteza del pan de molde artesanal ($1,63 \pm 1,90$ Log UFC/g). La corteza del pan candeal artesanal fue la que presentó los mayores recuentos de mohos ($1,85 \pm 0,21$ Log UFC/g), mientras que la miga del pan de molde artesanal fue donde se observaron los menores recuentos ($0,42 \pm 0,85$ Log UFC/g). La presencia de mohos en el pan puede deberse a dos aspectos: uno de ellos es la posible presencia de estos microorganismos en las materias primas, como lo demuestran algunos autores (Cardoso et al., 2019; Legan, 1993), quienes encontraron unos recuentos entre 1,88 y 5,46 Log UFC/g en harina de trigo; y el otro es que estos mohos lleguen al producto terminado por contaminación aérea, indicador de malas prácticas higiénicas debido a que el establecimiento no ha sido limpiado, desinfectado y ventilado correctamente. Los establecimientos elaboradores o panaderías son lugares donde se produce condensación debido a los procesos que se llevan a cabo, lo cual crea unas condiciones favorables para que los mohos puedan crecer. Los recuentos totales de mohos y levaduras de este estudio, entre 0,85 Log UFC/g y 2,47 Log UFC/g, estuvieron en el rango de los encontrados por Katsi et al. (2021), quienes encontraron valores de 2 Log UFC/g en un pan estándar. De acuerdo con Atanda et al. (2011) las micotoxinas pueden encontrarse en el producto después de 24 h de haberse producido la contaminación de estos microorganismos. Además, estos autores indican que ciertas especies de mohos de los géneros de *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* crecen durante el almacenamiento de alimentos, a una a_w de 0,65. De esta manera, si el pan llegara a contaminarse, estos microorganismos podrían producir micotoxinas debido a que todos los tipos de panes analizados en el presente estudio tuvieron una a_w superior a 0,65 (**Anexo I**).

Todas las muestras analizadas tuvieron recuentos de *E. coli* por debajo del LOQ, por lo que estos resultados no se muestran en las tablas.

El PCA realizado se muestra en la **Figura 1**. El Componente 1 explicó el 25,09% de los datos, el Componente 2 el 15,64% y el Componente 3 el 13,41%, explicando en conjunto un 54,14% de la variabilidad en los datos originales. La prueba factorial, con la medición de Kaiser-Meyer-Olkin para Muestreo Idóneo, mostró un valor de KMO = 0,63469.

Figura 1. Análisis de Componentes Principales en función del tipo de pan y del tipo de establecimiento analizado



A: PCA por tipo de pan (○: Barra; □: Barra integral; ◇: Pan candeal; ×: Pan de molde) del Componente 1 (25,09%) frente al Componente 2 (15,64%); **B:** PCA por tipo de pan (○: Barra; □: Barra integral; ◇: Pan candeal; ×: Pan de molde) del Componente 2 (15,64%) frente al Componente 3 (13,41%); **C:** PCA por origen de pan (○: Artesanal; □: Industrial) del Componente 1 (25,09%) frente al Componente 2 (15,64%).

El Componente 1 está principalmente influenciado por FAM, levaduras, coliformes, *Bacillus* spp. y BAL. Las bacterias y levaduras son las que explican este primer componente, entre ellas *Bacillus* spp. que junto con coliformes son indicadores de calidad higiénica. Por lo tanto, el Componente 1 (células vegetativas) se puede asociar a la calidad higiénica de las instalaciones del establecimiento. El Componente 2 (esporulados) está relacionado con la presencia de microorganismos esporulados, mohos y clostridios, que estarían implicados la calidad del aire del establecimientos (Bernardi et al., 2019) o la materia prima. Estos dos grupos microbianos explican el 90% de este segundo componente. El Componente 3 es explicado principalmente por BAL y está indirectamente relacionado con *Clostridium* spp.

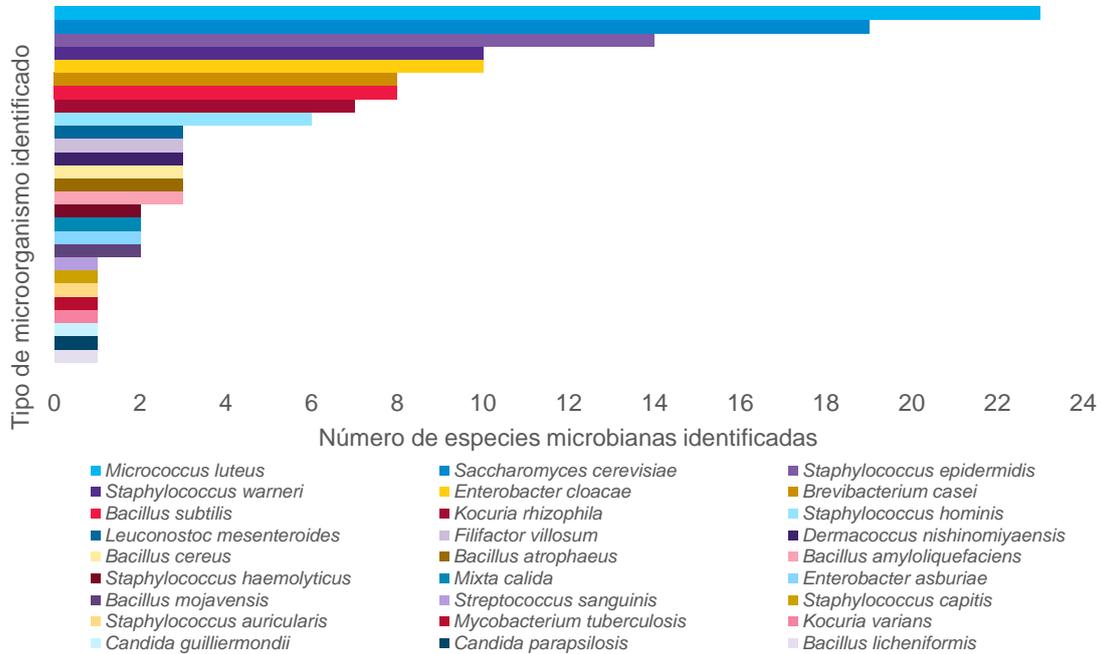
Como se observa en la **Figura 1**, el factor células vegetativas (Componente 1) separó adecuadamente el pan industrial del artesanal. Se observaron niveles más altos de los microorganismos que explican el Componente 1 para el pan artesanal, indicando menor calidad higiénica en el procesado en este tipo de pan (**Figura 1 C**). El factor esporulados (Componente 2) no fue capaz de separar los panes según su origen. Sin embargo, a partir del factor esporulados se separaron los tipos de panes (**Figura 1 A y B**) en base a sus recuentos de mohos y *Clostridium* spp. El pan integral tanto industrial como artesanal presentó un alto recuento de mohos tanto en corteza como en la miga (1,02 – 1,39 UFC/g). El pan candeal, que a pesar de tener los niveles de *Clostridium* spp. por debajo de su LOQ, presentó el mayor recuento de mohos (1,85 ± 0,21 Log UFC/g) que además de la calidad del aire, la calidad de la materia podría explicar este componente. Recientemente Cardoso et al., (2019) encontró un recuento superior de mohos en la harina de trigo integral respecto a harina refinada, con 5,46 y 2,46 Log UFC/G respectivamente. Además, el Componente 1 explicó de manera concreta el tipo de pan barra (**Figura 1 A**), debido a sus altos niveles de *Bacillus* spp. (entre 2,69 ± 1,12 y 1,80 ± 2,37 Log UFC/g) explicados por este componente. Por último, el Componente 3 explicó específicamente el pan de molde (**Figura 1 B**), con mayores recuentos para BAL (1,48 ± 1,19 Log UFC/g), grupo microbiano responsable de este componente. La presencia de especies bacterianas como BAL en el pan de molde permiten considerar este tipo de pan como una opción viable para su uso en el reprocesado de los panes. Sin embargo, la existencia de potenciales microorganismos patógenos en panes como el candeal, con un alto nivel de mohos o *Bacillus* spp., hacen necesario su estudio en profundidad antes de utilizarlos como materias primas para la elaboración de nuevos productos. Sin embargo, podrían considerarse como una alternativa los panes con recuentos microbianos elevados si a los nuevos productos elaborados a partir de los panes desechados se les aplica un tratamiento térmico suficiente que permita la destrucción de estas especies.

4.2 IDENTIFICACIÓN MICROBIANA MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

En la **Figura 2** se muestra la identificación de los microorganismos aislados de los distintos tipos de pan mediante MALDI-TOF. Se aislaron un total 139 cepas de los distintos tipos de pan estudiados. El 16,55 % de las cepas aisladas se identificaron como *Micrococcus luteus*. El segundo microorganismo mayoritario fue *S. cerevisiae* (13,67%). Además, el 14,39% de las cepas aisladas pertenecieron al género *Bacillus*, entre ellas *B. subtilis* (5,76%), siendo el séptimo microorganismo mayoritario; y *B. cereus* (2,16%). En menor medida se identificaron especies de diversos géneros como *Staphylococcus*, *Candida*, *Streptococcus sanguinis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Kocuria varians* y *B.*

licheniformis. Los microorganismos anteriormente mencionados fueron identificados con puntuaciones superiores a 1,700 según lo establecido por el proveedor (Bruker Daltonik).

Figura 2. Identificación de los principales microorganismos aislados del pan por MALDI-TOF



Para la interpretación de las referencias al color en la leyenda de esta figura, se sigue un orden de izquierda a derecha lineal para los datos mostrados en la figura ordenados de forma descendente.

M. luteus puede encontrarse en el pan debido a su gran resistencia al calor. El hábitat principal de *Micrococcus* es la piel de mamíferos, aunque también puede encontrarse en carne, productos lácteos, en el agua o en el suelo (Smith et al., 1999). La presencia de este microorganismo en el pan puede indicar unas prácticas de higiene inadecuadas, contaminación cruzada con otros alimentos o superficies contaminadas, o una incorrecta formación de los manipuladores de alimentos que pudieron ser el foco de transmisión de este microorganismo en el pan. Aunque las infecciones en humanos por especies de *Micrococcus* son poco habituales, se han informado casos de bacteriemia, endocarditis, ventriculitis, peritonitis, neumonía, endoftalmitis, queratólisis y artritis séptica como enfermedades causadas por *M. luteus* (Rohmatussolihat et al., 2018).

Respecto a *S. cerevisiae*, fue identificada en 13,67% de los aislamientos estudiados. Aunque *S. cerevisiae* es una especie domesticada por el hombre para su uso industrial, esta levadura puede aislarse fácilmente de panaderías, bodegas, cervecerías, destilerías o viñedos. También puede encontrarse en la naturaleza en diversas plantas y frutas, suelo, insectos y sus nidos, así como en humanos de forma comensal o incluso como patógeno (Greig & Leu, 2009). Otros autores han asociado la presencia de *S. cerevisiae* con el crecimiento de otras levaduras como *Candida* o *Pichia*, identificando

la primera de ellas en los panes analizados en este estudio en el 1,44% de las cepas aisladas, lo que indica que estas levaduras forman biopelículas mixtas (Suiker et al., 2021). Se sabe que las células que forman biopelículas tienen una mayor resistencia al estrés y no se eliminan fácilmente, pudiendo recolonizar en 2-12 h (Quain & Storgards, 2009; Storgards et al., 2006). Además, algunos autores han estudiado la subespecie *diastaticus* de *S. cerevisiae*, y se ha determinado que la prevalencia de sus células vegetativas y ascosporas en la naturaleza y en la industria cervecera son la principal causa del deterioro por hongos en las bebidas fermentadas carbonatadas (Suiker et al., 2021). A pesar de ello, es posible que la presencia de este microorganismo aislado del pan se deba principalmente a levaduras de uso industrial.

Staphylococcus spp. se identificó en el 24,46% de las muestras de distintos tipos de pan estudiadas. Otros autores (Rumjuankiat et al., 2017) encontraron este grupo microbiano en masa de hojaldre con una frecuencia del 30,66%. Estos autores encontraron un 5,25% de *S. epidermidis*, un 2,25% de *S. warneri*, un 2,25% de *S. haemolyticus* y un 1,5% de *S. hominis* en masa de hojaldre, entre otras cepas de este género. En este estudio se identificaron un 10,07% de *S. epidermidis*, un 7,19% de *S. warneri*, un 1,44% de *S. haemolyticus* y un 4,32% de *S. hominis* en distintos tipos de pan, entre otras cepas del mismo género. Los estafilococos a menudo se encuentran en el aire, el agua, el polvo, los alimentos, los seres humanos y los animales (Hait et al., 2014). *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* pueden producir enterotoxinas estafilocócicas extracelulares. Además, Rumjuankiat et al. (2017) indicaron que *S. hominis* puede resistir bajas temperaturas, *S. haemolyticus* puede sobrevivir a la congelación y, a pesar de que *S. epidermidis* no resiste estas condiciones de baja temperatura, su toxina puede permanecer en el producto terminado afectando a su seguridad alimentaria. Estos autores detectaron *S. epidermidis* y *S. warneri* en la etapa de formación de masa de hojaldre.

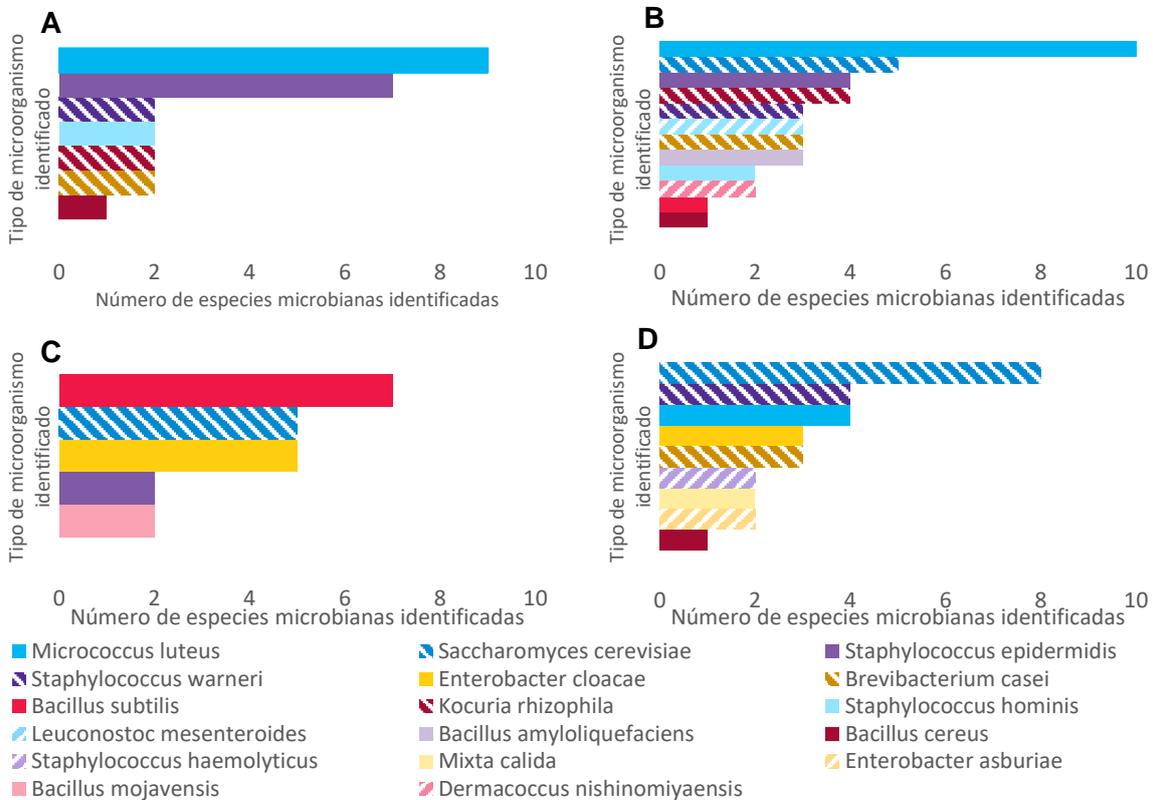
Las especies *Enterobacter* encontradas en este estudio fueron *E. cloacae* (7,19%) y *E. asburiae* (1,44%). Rumjuankiat et al. (2017) identificaron en masa de hojaldre un 37,33% de *Enterobacter* spp., identificando un 16,5% de *E. asburiae* y un 3,75% de *E. cloacae*, entre otras cepas de este género. *Enterobacter* spp. se encuentran normalmente en el suelo, el agua y las plantas y pueden vivir como flora normal en el tracto gastrointestinal. Rumjuankiat et al. (2017) indicaron que *E. asburiae* sobrevivió en la línea de congelación de choque del hojaldre, sometida a una temperatura de -60 °C a -70 °C durante 13-18 min. Por otra parte, la mayoría de las cepas que pertenecieron a esta especie fueron aisladas del medio CHROMagar, mas aún ninguna de las cepas presuntas *Salmonella* spp. fueron confirmadas en la identificación por MALDI-TOF.

En este estudio se identificaron un 5,76% de cepas de *B. subtilis* y un 2,16% de *B. cereus* en los panes analizados. Valerio et al. (2012) encontraron en muestras de pan un 9,1% de *B. subtilis* y un 18,2% de *B. cereus*, observándose en el caso de estos autores una mayor identificación de estas especies en comparación con el presente estudio. Además, estos autores observaron la presencia de *B. amyloliquefaciens* en un 68,2% de las muestras de pan estudiadas, mientras que en este estudio esta cepa fue identificada en un 2,16% de las muestras de los distintos tipos de pan analizados. *B. licheniformis* también fue identificada (0,72%), y su presencia ha sido relacionada por otros autores con harina y pan alterados (Pepe et al., 2003; Sorokulova et al., 2003). Estas bacterias pueden causar el deterioro de la cuerda en el pan, especialmente *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* (Valerio et al., 2012). Por su parte, *B. cereus* además de causar el deterioro de la cuerda puede ocasionar dos tipos de intoxicaciones alimentarias: la forma diarreica, ocasionada por la ingestión de esporas bacterianas que producen enterotoxinas en el intestino; y la forma emética, asociada a la ingestión de una toxina preformada en el alimento (Duc et al., 2005). La concentración de *B. cereus* causante de enfermedad en el ser humano es de 5 Log UFC/g (Kaur, 1986).

Mycobacterium tuberculosis fue identificada en un 0,72% de las muestras de pan analizados por MALDI-TOF. El complejo de bacterias pertenecientes a *M. tuberculosis* comprende *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* o *M. microti*, entre otros (Rastogi et al., 2001). Las bacterias de este complejo se consideran subespecies debido a su similitud del 99,9% a nivel de nucleótidos. Es por ello que la identificación de *M. tuberculosis* realizada en este estudio, con una puntuación de 1,703 por MALDI BioTyper, es una probable identificación del género bacteriano, pero con un bajo nivel de seguridad sobre la identificación de la especie. Podría completarse con una identificación fenotípica o genética como una PCR para poder comprobar la presencia de esta especie en pan. Por ejemplo, *M. bovis* puede infectar una gran variedad de especies de mamíferos, incluido el hombre (O'Reilly & Daborn, 1995), mientras que la infección por *M. tuberculosis* es casi exclusivamente humana (Neill et al., 2005). Por tanto, no es posible asegurar el origen de esta cepa bacteriana identificada en las muestras de pan. En caso de confirmar ser *M. bovis* podría tener origen en la leche en polvo utilizada para la elaboración del pan de molde (muestra de pan donde se identificó esta cepa, como se observa en la **Figura 3**), pues esta especie bacteriana puede transmitirse a los humanos por el consumo de productos lácteos de animales enfermos (Grange, 2001). En cualquier caso, es una bacteria con potencial patógeno que no sobrevive a las condiciones del horneado del pan y que su presencia en el producto terminado es por una probable contaminación cruzada o por malas prácticas higiénicas.

En la **Figura 3** se muestra la identificación de los principales microorganismos aislados del pan realizada mediante MALDI-TOF en función del tipo de pan.

Figura 3. Identificación de los principales microorganismos aislados del pan por MALDI-TOF en función del tipo de pan analizado



A: Identificación para Barra; **B:** Identificación para Barra integral; **C:** Identificación para Pan candeal; **D:** Identificación para Pan de molde

La barra y la barra integral presentaron como principal microorganismo identificado *M. luteus* (31,03% y 20,83% respectivamente). Ambos tipos de panes también mostraron la presencia de *B. cereus*. En España, el pan fresco normal es el pan con mayor consumo per cápita (23,82 kg/persona/año) según los datos del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (2020), con un consumo medio superior al resto de panes. La alta demanda de la barra puede explicar una manipulación elevada de la misma en el establecimiento expendedor, lo que puede explicar la presencia de *M. luteus* (31,03%) en este tipo de pan. A pesar de ser un pan con una alta demanda en comparación con el resto de tipos de pan analizados, se identificaron especies de *Bacillus* en un 6,90% así como especies de *Staphylococcus* (37,93%), siendo la mayoritaria *S. epidermidis* con un 24,14%. La contaminación cruzada y las malas prácticas higiénicas y de manipulación de este tipo de pan pueden explicar su contaminación, por lo que una correcta formación y concienciación de los manipuladores de alimentos podría ser una solución a este desarrollo microbiano que no debería estar presente tras el horneado del pan.

El consumo en España del pan fresco integral se sitúa en 2,18 kg/persona/año en el año 2020 (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2020). El menor consumo del pan integral puede explicar una presencia generalizada de varios grupos microbianos debido al estancamiento de este tipo de pan en el punto de venta y, por ello, tener un mayor riesgo de contaminación cruzada o contaminación por el ambiente del obrador. Por una parte, la presencia de *M. luteus* (20,83%) puede ser explicada por la manipulación intermedia de este tipo de pan, comparada con otros tipos de pan menos demandados, en el establecimiento expendedor. Sin embargo, su baja preferencia por parte de los consumidores puede suponer un mayor riesgo de contaminación por especies de *Staphylococcus* (20,83%), cuya presencia puede tener origen en la contaminación por el aire, el agua, el polvo, otros alimentos o la propia manipulación humana en el establecimiento (Hait et al., 2014). La presencia de un 12,50% de *Bacillus* spp. indica una posible contaminación con materias primas contaminadas y un riesgo elevado de desarrollo en este tipo de pan del deterioro de la cuerda. La presencia de estos microorganismos también puede ser explicada por la presencia en la harina integral del pericarpio del cereal, expuesto a mayor contaminación por aire o polvo.

En el caso del pan candeal, el microorganismo mayoritario fue *B. subtilis* (26,92%) y, a diferencia del resto de panes, no se observó presencia de *B. cereus*. A pesar de no existir datos oficiales del consumo de otros tipos de panes en España, un estudio sobre los hábitos de consumo y la percepción de los consumidores sobre el pan realizado por el grupo de investigación sobre cereales Innograin (2021) indicó que los panes de baja hidratación (como los candeales) tuvieron una preferencia del 11% entre los encuestados. Es llamativo que el pan candeal, que por definición es un pan de baja hidratación, mostrara los recuentos y la identificación más elevados de *Bacillus* spp. (42,31%), microorganismos que requieren una $a_w > 0,95$ para crecer. Sin embargo, a pesar de ser un pan por definición de baja hidratación, la miga del pan candeal artesanal mostró los mayores resultados para a_w ($0,99 \pm 0,00$) (**Anexo I**). Concretamente, *B. subtilis* se identificó en el 26,92% de las muestras de pan candeal. Esto puede ser debido a una incorrecta manipulación del producto terminado o debido a una localización en el establecimiento para su exposición y venta en un lugar apartado y menos limpio por su reducida demanda o éxito comercial. Por lo tanto, estos datos pueden indicar un riesgo incrementado de desarrollar este tipo de pan el deterioro de la cuerda.

Por su parte, el pan de molde tuvo una identificación del 22,22% de *S. cerevisiae*, siendo el principal microorganismo presente en este tipo de pan. Además, se identificaron microorganismos patógenos como *E. cloacae* (8,33%), *B. cereus* (2,78%) o *M. tuberculosis* (2,78%), entre otros, como puede observarse en el **Anexo II**. En el

estudio anteriormente mencionado realizado por el grupo de investigación de Innograin (2021) se indicó una preferencia de los panes de molde del 8%, reducida en comparación con otros tipos de pan. La localización para la venta de este tipo de panes menos demandados en el establecimiento expendedor puede suponer un foco de contaminación microbiana, como ha sido explicado anteriormente. Estos resultados ponen de manifiesto la contaminación tras el horneado que sufre el pan, bien por contaminación cruzada con otros alimentos o ingredientes, por contaminación aérea o por malas prácticas higiénicas y de manipulación.

5 CONCLUSIONES

La presencia de microorganismos como coliformes, *Bacillus* spp., FAM, mohos y levaduras revela que se requiere implementar o mejorar las buenas prácticas de higiene alimentaria tanto en procesos productivos artesanales como industriales. La certificación de la calidad de las materias primas, la desinfección de superficies de contacto y la formación y concienciación de los manipuladores de alimentos podrían ser algunas de las medidas que permitan reducir la contaminación del pan.

El pan es considerado un alimento estable tras el horneado, pero su deterioro causado por re-contaminación y crecimiento bacteriano hace que su vida útil se vea comprometida. Los microorganismos identificados de forma mayoritaria en este estudio fueron *Bacillus* spp., coliformes y FAM. De forma general, los recuentos de *Clostridium* spp., *Salmonella* spp. y levaduras fueron minoritarios en las muestras analizadas. Entre los microorganismos aislados del pan identificados por MALDI-TOF se encontraron especies con un potencial patógeno como *E. cloacae*, *B. cereus*, *E. asburiae*, *M. tuberculosis*, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*, cuya presencia en el pan pudo ser debida a contaminación cruzada o a malas prácticas de higiene y manipulación tras la cocción de este producto.

El nivel de mohos encontrados en este estudio, teniendo en cuenta que la a_w de los panes evaluados fue superior a 0,65, revela que en estos tipos de pan los mohos podrían formar micotoxinas cuando son almacenados durante más de 24 h a altas temperaturas. Se necesitan más estudios donde se analicen diferentes tipos de pan en función del tipo de elaboración u origen para poder establecer la posible formación de micotoxinas. De esta forma, se podrían evaluar las diversas condiciones ambientales y de temperatura que permitirían alcanzar niveles de crecimiento microbiano en el pan que pudieran advertir potenciales problemas de seguridad alimentaria.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Alfonzo, A., Ventimiglia, G., Corona, O., Di Gerlando, R., Gaglio, R., Francesca, N., Moschetti, G., & Settanni, L. (2013). Diversity and technological potential of lactic acid bacteria of wheat flours. *Food Microbiology*, 36, 343–354. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.003>
- Atanda, S. A., Pessu, P. O., Agoda, S., Isong, I. U., Adekalu, O. A., Echendu, M. A., & Falade, T. C. (2011). Fungi and mycotoxins in stored foods. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 4373–4382. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.487>
- Berghofer, L. K., Hocking, A. D., Miskelly, D., & Jansson, E. (2003). Microbiology of wheat and flour milling in Australia. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 137–149. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00507-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00507-X)
- Bernardi, A. O., Garcia, M. V., & Copetti, M. V. (2019). Food industry spoilage fungi control through facility sanitization. *Current Opinion in Food Science*, 29, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.006>
- BREAD4PLA. (2014). *Demonstration plant project to produce Poly-Lactic Acid (PLA) biopolymer from waste products of bakery industry*. <http://bread4pla.aimplas.es/>
- Cardoso, R. V. C., Fernandes, Á., Heleno, S. A., Rodrigues, P., González-Paramás, A. M., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Physicochemical characterization and microbiology of wheat and rye flours. *Food Chemistry*, 280, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.063>
- Chaudhry, R. (1998). Outbreak of suspected *Clostridium butyricum* botulism in India. *Emerging Infectious Diseases*, 4, 506–507. <https://doi.org/10.3201/eid0403.980347>
- Cook, F. K., & Johnson, B. L. (2009). Microbiological spoilage of cereal products. In W. Sperber & M. Doyle (Eds.) *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages* (pp. 223–244). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_8
- Curti, E., Carini, E., Tribuzio, G., & Vittadini, E. (2014). Bread staling: effect of gluten on physico-chemical properties and molecular mobility. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 418–425. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.057>
- Deible, K. E., & Swanson, K. M. J. (2001). Cereal and cereal products. In F.P. Downes & K. Ito (Eds.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (4th ed., pp. 549–553). American Public Health Association, Washington, DC.
- Doyle, M. P., & Buchanan, R. L. (2012). *Food microbiology: fundamentals and frontiers* (4th ed.). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555818463>
- Duc, L. H., Dong, T. C., Logan, N. A., Sutherland, A. D., Taylor, J., & Cutting, S. M. (2005). Cases of emesis associated with bacterial contamination of an infant breakfast cereal product. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 245–251.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.022>
- EFSA. (2005). Opinion of the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in foodstuffs. *EFSA Journal*, 175, 1–48. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.175>
- Eglezos, S. (2010). Microbiological quality of wheat grain and flour from two mills in Queensland, Australia. *Journal of Food Protection*, 73, 1533–1536. <https://doi.org/https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.8.1533>
- El-Gazzar, F. E., & Marth, E. H. (1992). *Salmonellae*, Salmonellosis, and dairy foods: a review. *Journal of Dairy Science*, 75, 2327–2343. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77993-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77993-4)
- Evans, M. R., Tromans, J. P., Dexter, E. L. S., Ribeiro, C. D., & Gardner, D. (1996). Consecutive *Salmonella* outbreaks traced to the same bakery. *Epidemiology and Infection*, 116, 161–167. <https://doi.org/10.1017/S0950268800052390>
- Fuentes, L., Mateo, J., Quinto, E. J., & Caro, I. (2015). Changes in quality of nonaged pasta filata Mexican cheese during refrigerated vacuum storage. *Journal of Dairy Science*, 98, 2833–2842. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8152>
- Grange, J. M. (2001). *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis*, 81, 71–77. <https://doi.org/10.1054/tube.2000.0263>
- Greig, D., & Leu, J.-Y. (2009). Natural history of budding yeast. *Current Biology*, 19, R886–R890. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.037>
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., Otterdijk, R. Van, & Meybeck, A. (2011). *Global food losses and food waste: extent, causes and prevention*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Hait, J., Tallent, S., Melka, D., Keys, C., & Bennett, R. (2014). Prevalence of enterotoxins and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from a bakery involved in a second staphylococcal food poisoning occurrence. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 866–875. <https://doi.org/10.1111/jam.12571>
- Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14, 467–494. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.005>
- Innograin*. (2021). Hábitos de Consumo y Percepción de Los Consumidores. <https://innograin.uva.es/>. Accessed June 15, 2021
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (1986). *Sampling for microbiological analysis: principles and scientific applications* (2nd ed.). Blackwell Science Ltd.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2008). *Modern food microbiology* (4th ed.). Springer Science & Business Media.

- Katsi, P., Kosma, I. S., Michailidou, S., Argiriou, A., Badeka, A. V., & Kontominas, M. G. (2021). Characterization of artisanal spontaneous sourdough wheat bread from central greece: evaluation of physico-chemical, microbiological, and sensory properties in relation to conventional yeast leavened wheat bread. *Foods*, *10*, 1–23. <https://doi.org/10.3390/foods10030635>
- Kaur, P. (1986). Survival and growth of *Bacillus cereus* in bread. *Journal of Applied Bacteriology*, *60*, 513–516. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb01090.x>
- Kramer, J. M., & Gilbert, R. J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In M.P. Doyle (Eds.) *Foodborne bacterial pathogens*. Marcel Dekker Inc.
- Lappin, R. (2016). Toast Ale media coverage portfolio. *Emergency Medicine*, *48*, 1–5. <https://doi.org/10.22456/2527-2616.75900>
- Latimer, G. W. J., & AOAC International. (2016). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International* (20th ed.). Rockville, MD: AOAC International.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., De Bellis, P., Sisto, A., & Leguérinel, I. (2016). Sporeforming bacteria associated with bread production: spoilage and toxigenic potential. In P. Kotzekidou (Eds.) *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods* (1st ed.). Elsevier Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801916-0.00016-9>
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., & Gobetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*, 4084–4090. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4084-4090.2000>
- Legan, J. D. (1993). Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *32*, 33–53. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(93\)90038-4](https://doi.org/10.1016/0964-8305(93)90038-4)
- Legan, J. D., & Voysey, P. A. (1991). Yeast spoilage of bakery products and ingredients. *Journal of Applied Bacteriology*, *70*(5), 361–371. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02950.x>
- Martínez Viedma, P., Abriouel, H., Ben Omar, N., López, R. L., & Gálvez, A. (2011). Inhibition of spoilage and toxigenic *Bacillus* species in dough from wheat flour by the cyclic peptide enterocin AS-48. *Food Control*, *22*, 756–761. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.010>
- Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. (2019). *El desperdicio alimentario generado en los hogares 2018*. <https://cutt.ly/DmtUtoD>
- Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. (2020). *Informe del consumo alimentario en España 2020*. <https://cutt.ly/LmtUgKb>

- Neill, S. D., Skuce, R. A., & Pollock, J. M. (2005). Tuberculosis - new light from an old window. *Journal of Applied Microbiology*, *98*, 1261–1269. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02599.x>
- O'Reilly, L. M., & Daborn, C. J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease*, *76*, 1–46. [https://doi.org/10.1016/0962-8479\(95\)90591-X](https://doi.org/10.1016/0962-8479(95)90591-X)
- Pepe, O., Blaiotta, G., Moschetti, G., Greco, T., & Villani, F. (2003). Rope-producing strains of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*, 2321–2329. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2321-2329.2003>
- Quain, D., & Storgards, E. (2009). The extraordinary world of biofilms. *Brewer & Distiller International*, *5*, 31–33.
- Rastogi, N., Legrand, E., & Sola, C. (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, *20*, 21–54. <https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1265>
- Richter, K. S., Dorneanu, E., Eskridge, K. M., & Rao, C. S. (1994). Microbiological quality of flours. *Cereal Foods World (USA)*, *38*, 367–369.
- Rohmatussolihat, R., Lisdiyanti, P., Yopi, Y., Widyastuti, Y., & Sukara, E. (2018). Medium optimization for antimicrobial production by newly screened lactic acid bacteria. *Annales Bogorienses-Journal of Tropical General Botany*, *22*, 1–11.
- Rumjuankiat, K., Keawsompong, S., & Nitisinprasert, S. (2017). Bacterial contaminants from frozen puff pastry production process and their growth inhibition by antimicrobial substances from lactic acid bacteria. *Food Science & Nutrition*, *5*, 454–465. <https://doi.org/10.1002/fsn3.413>
- Sabillón, L., & Bianchini, A. (2016). From field to table: a review on the microbiological quality and safety of wheat-based products. *Cereal Chemistry Journal*, *93*, 105–115. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-06-15-0126-RW>
- Saranraj, P., & Geetha, M. (2012). Microbial spoilage of bakery products and its control by preservatives. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, *3*, 38–48.
- Saranraj, P., & Sivasakthivelan, P. (2015). Microorganisms involved in spoilage of bread and its control measures. In *Bread and its fortification* (1st ed., pp. 132–149).
- Smith, J. P., Daifas, D. P., El-Khoury, W., Koukoutsis, J., & El-Khoury, A. (2004). Shelf life and safety concerns of bakery products - a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*, 19–55. <https://doi.org/10.1080/10408690490263774>
- Smith, Neafie, Yeager, & Skelton. (1999). *Micrococcus folliculitis* in HIV-1 disease. *British Journal of Dermatology*, *141*, 558–561. <https://doi.org/10.1046/j.1365->

2133.1999.03060.x

- Sorokulova, I. B., Reva, O. N., Smirnov, V. V., Pinchuk, I. V., Lapa, S. V., & Urdaci, M. C. (2003). Genetic diversity and involvement in bread spoilage of *Bacillus* strains isolated from flour and rony bread. *Letters in Applied Microbiology*, *37*, 169–173. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01372.x>
- Sperber, W. H. (2007). Role of microbiological guidelines in the production and commercial use of milled cereal grains: a practical approach for the 21st century. *Journal of Food Protection*, *70*, 1041–1053. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.4.1041>
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, *36*, 1–29. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0)
- Storgards, E., Tapani, K., Hartwall, P., Saleva, R., & Suihko, M.-L. (2006). Microbial attachment and biofilm formation in brewery bottling plants. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *64*, 8–15. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-64-0008>
- Suiker, I. M., Arkesteyjn, G. J. A., Zeegers, P. J., & Wösten, H. A. B. (2021). Presence of *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *diastaticus* in industry and nature and spoilage capacity of its vegetative cells and ascospores. *International Journal of Food Microbiology*, *347*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109173>
- Tallent, S. M., Knolhoff, A., Rhodehamel, E. J., Harmon, S. M., & Bennett, R. W. (2020). BAM Chapter 14: *Bacillus cereus* | FDA. In *Bacteriological analytical manual* (8th ed.).
- Valerio, F., De Bellis, P., Di Biase, M., Lonigro, S. L., Giussani, B., Visconti, A., Lavermicocca, P., & Sisto, A. (2012). Diversity of spore-forming bacteria and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* as a species frequently associated with the rony spoilage of bread. *International Journal of Food Microbiology*, *156*, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.005>
- Valerio, F., Di Biase, M., Huchet, V., Desriac, N., Lonigro, S. L., Lavermicocca, P., Sohier, D., & Postollec, F. (2015). Comparison of three *Bacillus amyloliquefaciens* strains growth behaviour and evaluation of the spoilage risk during bread shelf-life. *Food Microbiology*, *45*, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.006>
- Van Der Zee, H., & Huis In T Veld, J. H. J. (1997). Rapid and alternative screening methods for microbiological analysis. *Journal of AOAC International*, *80*, 934–940. <https://doi.org/10.1093/jaoac/80.4.934>
- Vora, H. M., & Sidhu, J. S. (1987). Effect of varying concentrations of ethyl alcohol and carbon dioxide on the shelf life of bread. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie Der Lebensmittel (Germany, F.R.)*, *11*, 56–59.

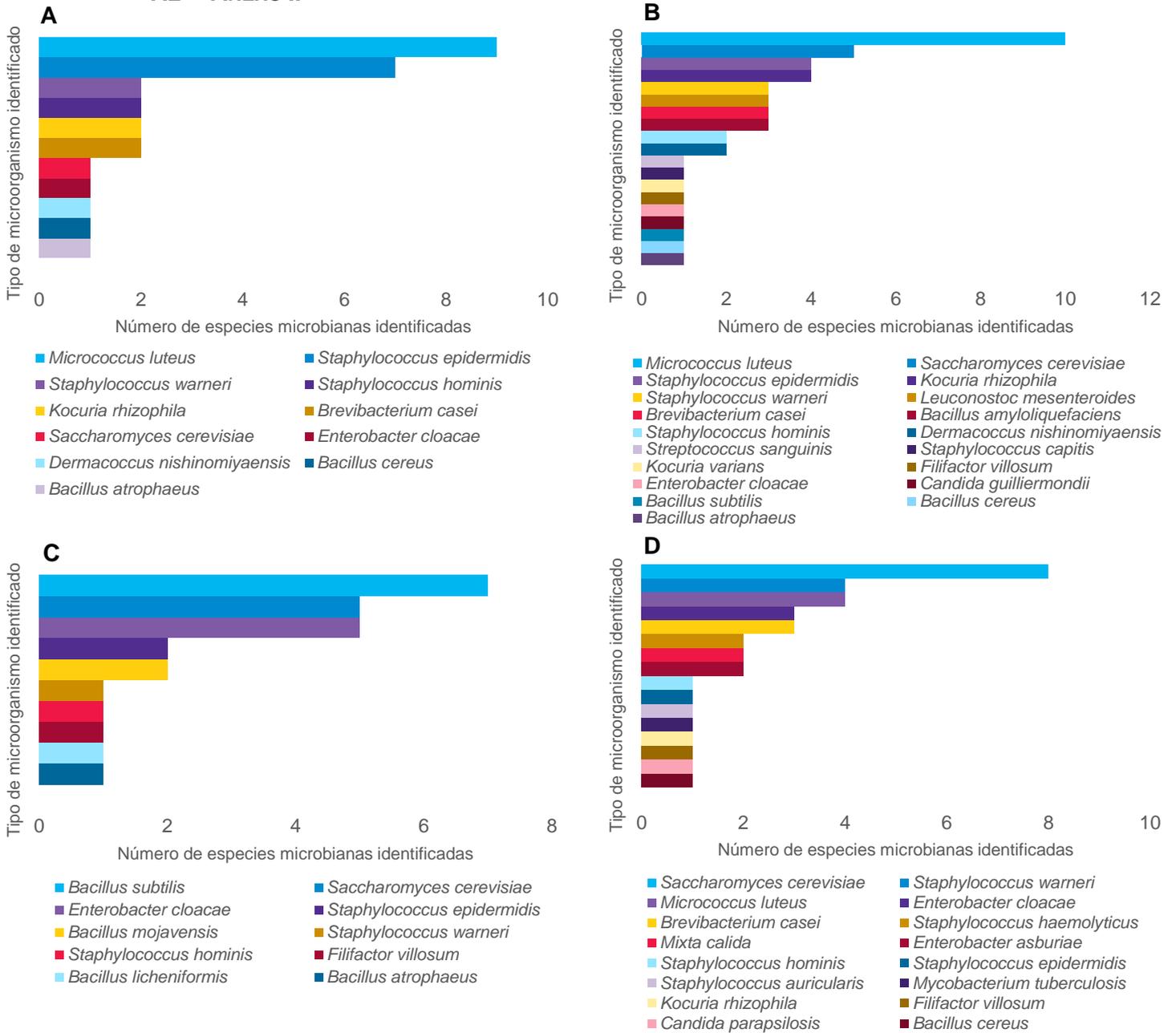
7 ANEXOS

7.1 ANEXO I

Establecimiento	Tipo de pan	Corteza/ Miga	a_w	pH	NaCl g/100 g	Humedad g/100 g	Ratio NaCl/Humedad %
Artesanal	Barra	Corteza	0,87 ± 0,05 ^a	5,73 ± 0,12 ^{ab}	1,65 ± 0,30 ^{def}	17,53 ± 0,63 ^a	9,46 ± 1,83 ^h
		Miga	0,98 ± 0,00 ^c	5,82 ± 0,20 ^{ab}	1,20 ± 0,15 ^a	41,99 ± 3,24 ^e	2,86 ± 0,34 ^a
	Barra integral	Corteza	0,85 ± 0,03 ^a	5,63 ± 0,15 ^{ab}	1,97 ± 0,13 ^f	23,10 ± 2,06 ^b	8,53 ± 0,28 ^{fgh}
		Miga	0,97 ± 0,00 ^c	6,19 ± 0,42 ^c	1,42 ± 0,05 ^{abcd}	44,65 ± 2,49 ^e	3,20 ± 0,08 ^{ab}
	Pan candeal	Corteza	0,87 ± 0,05 ^a	5,64 ± 0,11 ^{ab}	1,73 ± 0,17 ^{def}	19,24 ± 0,87 ^{ab}	9,04 ± 1,13 ^{gh}
		Miga	0,99 ± 0,00 ^c	5,69 ± 0,13 ^{ab}	1,21 ± 0,11 ^{ab}	34,41 ± 0,44 ^d	3,53 ± 0,36 ^{ab}
	Pan de molde	Corteza	0,85 ± 0,02 ^a	5,68 ± 0,33 ^{ab}	1,61 ± 0,37 ^{cdef}	31,13 ± 4,71 ^{cd}	5,15 ± 0,61 ^{cd}
		Miga	0,97 ± 0,01 ^c	5,66 ± 0,43 ^{ab}	1,28 ± 0,10 ^{abc}	42,13 ± 6,21 ^e	3,06 ± 0,26 ^a
Industrial	Barra	Corteza	0,90 ± 0,06 ^{ab}	5,82 ± 0,08 ^{ab}	1,63 ± 0,30 ^{cdef}	18,79 ± 0,18 ^{ab}	8,68 ± 1,53 ^{fgh}
		Miga	0,98 ± 0,01 ^c	5,92 ± 0,22 ^{bc}	1,28 ± 0,25 ^{abc}	41,50 ± 1,89 ^e	3,08 ± 0,49 ^a
	Barra integral	Corteza	0,87 ± 0,06 ^a	5,50 ± 0,09 ^a	1,71 ± 0,29 ^{def}	23,27 ± 4,61 ^b	7,38 ± 0,42 ^{ef}
		Miga	0,96 ± 0,00 ^c	5,55 ± 0,08 ^a	1,25 ± 0,41 ^{ab}	43,91 ± 7,44 ^e	2,81 ± 0,75 ^a
	Pan candeal	Corteza	0,88 ± 0,08 ^a	5,66 ± 0,09 ^{ab}	1,56 ± 0,46 ^{bcde}	20,47 ± 0,83 ^{ab}	7,71 ± 2,56 ^{efg}
		Miga	0,97 ± 0,00 ^c	5,72 ± 0,13 ^{ab}	1,25 ± 0,22 ^{ab}	35,68 ± 5,06 ^d	3,49 ± 0,24 ^{ab}
	Pan de molde	Corteza	0,87 ± 0,09 ^a	5,71 ± 0,32 ^{ab}	1,86 ± 0,23 ^{ef}	29,22 ± 2,91 ^c	6,36 ± 0,58 ^{de}
		Miga	0,95 ± 0,00 ^{bc}	5,74 ± 0,41 ^{ab}	1,64 ± 0,06 ^{cdef}	35,79 ± 1,57 ^d	4,58 ± 0,13 ^{bc}

^{a-h} Columnas con distintas letras indica diferencias significativas ($p < 0,05$). $n = 4$, cada valor corresponde a la media de 4 ensayos

7.2 ANEXO II



A: Identificación para Barra; **B:** Identificación para Barra integral; **C:** Identificación para Pan candeal; **D:** Identificación para Pan de molde. Para la interpretación de las referencias al color en la leyenda de esta figura, se sigue un orden de izquierda a derecha lineal para los datos mostrados en la figura ordenados de forma descendente.